

Hematolojik Malignansili Hastalarda Gelişen Diyare Olgularında Clostridium Difficile Toksinlerinin Araştırılması

Detection of Clostridium Difficile Toxins on Patients With Hematological Malignency

¹Gül Durmaz, ²Meltem Olga Akay, ¹Mehdi Meskini Heydarlou

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye
²Koç Üniversitesi Hastanesi, Hematoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

Özet: Clostridium difficile, asemptomatik taşıyıcılık, ılımlı diyare, psödomebranöz kolit, psödomebranöz kolit (PMK), fulminant kolit/toksik megakolon gibi çok çeşitli klinik tablolara neden olabilen insan gastrointestinal sistem mikrobiyotaya üyesi, gram pozitif, sporlu anaerob çomakçiktir. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı sonrası kolonda bulunan C.difficile suşları ekolojik avantaj kazanıp çoğalmakta ve toksin sentezleyerek ishale neden olmaktadır. Son 20 yılda gerek hastane, gerekse toplum kaynaklı C.difficile enfeksiyonlarının insidans ve mortalitesinde belirgin bir artış olduğu göze çarpmaktadır. Bu çalışmada Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hastanesi Hematoloji ve Onkoloji kliniklerinde terapötik veya profilaktik amaçlı geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı sonrasında ishal gelişen hastaların dışkılarında toksijenik C.difficile varlığının iki farklı immünoagnostik testin yanısıra moleküler test kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Ocak- Haziran 2015 tarihleri arasında Hematoloji ve Onkoloji kliniklerinde yatan ve diyare gelişen 82 hastanın dışkı örnekleri incelenmiştir. Dışkı örnekleri kapaklı, sızdırmaz transport dışkı kaplarında bir saat içinde Mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırılmıştır. Glutamat dehidrogenaz enzimi (GDH) ve toksin A ve B saptamada EIA (enzim immunoassay) yöntemi (TECH LAB, Inc.), toksin B genini saptamada ise real-time PCR yöntemi (BD GeneOhm™ Cdiff Assay) kullanılmıştır. Elli altı örnekte her üç testle negatif sonuç elde edilmiş olup, dokuz hastada da yapılan testlerden en az iki tanesi pozitif olarak bulunmuştur. Üç hastada ise EIA (GDH, toksin A ve B) testleri pozitif iken moleküler yöntemle negatif sonuç alındı. Moleküler yöntem ile saptanan ve yalnızca negatiflik olarak kabul ettiğimiz bu durumun tcdB geninde gerçekleşen mutasyon veya sadece toksin B-/binary toksin sentezleyen suş nedeniyle olduğu düşünülmüştür. GDH EIA testinin riskli hasta gruplarına uygulanacak güvenilirlikte bir tarama testi olduğu ve GDH pozitifliği durumunda ise toksin A ve B saptayan immünoagnostik testler veya toksin B genini saptayan moleküler testlerden biriyle sonucun doğrulanmasının uygun bir yaklaşım olacağı sonucuna varıldı. Bu çalışmada Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji ve Onkoloji kliniklerinde terapötik veya profilaktik amaçlı geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı sonrasında ishal gelişen hastaların dışkılarında toksijenik C.difficile varlığının iki farklı immünoagnostik testin yanısıra moleküler test kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Ocak-Haziran 2015 tarihleri arasında Hematoloji ve Onkoloji kliniklerinde yatan ve diyaresi olan 82 hastanın dışkı örnekleri incelenmiştir. Dışkı örnekleri kapaklı, sızdırmaz transport dışkı kaplarında bir saat içinde Mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırılmıştır. Glutamat dehidrogenaz enzimi (GDH) ve toksin A ve B saptamada EIA (enzim immunoassay) yöntemi (TECH LAB, Inc.), toksin B genini saptamada ise Real-Time PCR yöntemi (BD GeneOhm™ CdiffAssay) kullanılmıştır. Elli altı örnekte her üç testle negatif sonuç elde edilmiş olup, dokuz hastada da yapılan testlerden en az iki tanesi pozitif olarak bulunmuştur. Üç hastada ise EIA (GDH, toksin A ve B) testleri pozitif iken moleküler yöntemle negatif sonuç alındı. Moleküler yöntem ile saptanan ve yalnızca negatiflik olarak kabul ettiğimiz bu durumun tcdB geninde gerçekleşen mutasyon veya sadece toksin B-/binary toksin sentezleyen suş nedeniyle olduğu düşünülmüştür. GDH EIA testinin riskli hasta gruplarına uygulanacak güvenilirlikte bir tarama testi olduğu ve GDH pozitifliği durumunda ise toksin A ve B saptayan immünoagnostik testler veya toksin B genini saptayan moleküler testlerden biriyle sonucun doğrulanmasının uygun bir yaklaşım olacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Clostridium difficile; Toksin A; Toksin B; Diyare; Tamsal test.

ORCID ID of the authors: G.D 0000-0002-2002-8380, M.O.A. 0000-0002-6759-1939, M.M.H. 0000-0001-5858-8079

Received 30.05.2020

Accepted 09.09.2020

Online published 11.09.2019

Correspondence: Mehdi MESKİNİ HEYDARLOU-Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye
e-mail: mehdi.biology@gmail.com

Cite this article as:

Durmaz G, Akay MO, Heydarlou MM. Hematolojik Malignansili Hastalarda Gelişen Diyare Olgularında Clostridium Difficile Toksinlerinin Araştırılması, Osmangazi Journal of Medicine, 2020;42(6):596-602 Doi: 10.20515/otd.571859

Abstract: Clostridium difficile, the member of human gastrointestinal system microbiota, is a gram-positive, spore-forming anaerobic bacilli. It is present in the gastrointestinal tract in asymptomatic carriers, though; it can cause a variety of clinical features such as: mild diarrhea, non-pseudomembranous colitis, pseudomembranous colitis (PMC), and fulminant colitis/toxic megacolon. Following the use age of broad spectrum antibiotics, C.difficile strains gain benefit of ecological advantage and start to multiply and produce toxins leading to diarrhea. In the last 20 years, nosocomial and community acquired C.difficile infections showed significant increasing incidence and mortality rates. Our study is aimed to investigate toxigenic C.difficile in diarrheal stool specimens collected from in-patients of Eskişehir Osmangazi University Hospital Hematology and Oncology departments who receive broad spectrum antibiotics for prophylactic or therapeutic purposes. Toxigenic C.difficile was investigated by immunodiagnostic and molecular tests. During the period between January-June 2015, 82 diarrheal specimens were collected in suitable stool containers and sent to Microbiology laboratory within an hour. EIA method (TECH LAB, Inc.) was used to detect the presence of glutamate dehydrogenase enzyme (GDH) and toxins A plus B. Also, real-time PCR (BD GeneOhm™ Cdiff Assay) was used to detect toxin B gene. Fifty six samples were negative in all three tests performed. However; nine specimens were positive in at least two diagnostic tests performed. Three samples were positive by EIA (GDH, toxins A and B) while these specimens were negative by the molecular test. The negative result could be false negative due to tcdB gene mutation, or it could be due to toxin B-/binary toxin producing strain. According to our results, GDH EIA is a reliable initial screening test to be applied in high risk patients. Though, it would be an appropriate approach to verify GDH EIA positive results by performing either immuno diagnostic tests which detect toxin A and B or toxin B gene based molecular tests. Our study is aimed to investigate toxigenic C.difficile in diarrheal stool specimens collected from in-patients of Eskişehir Osmangazi University Hospital Hematology and Oncology departments who receive broad spectrum antibiotics for prophylactic or therapeutic purposes. Toxigenic C.difficile was investigated by immunodiagnostic and molecular tests. During the period between January-June 2015, 82 diarrheal specimens were collected in suitable stool containers and sent to Microbiology laboratory within an hour. EIA method (TECH LAB, Inc.) was used to detect the presence of glutamate dehydrogenase enzyme and toxins A plus B. Also, real-time PCR (BD GeneOhm™ Cdiff Assay) was used to detect toxin B gene. Fifty six samples were negative in all three tests performed. However; nine specimens were positive in at least two diagnostic tests performed. Three samples were positive by EIA (GDH, toxins A and B) while these specimens were negative by the molecular test. The negative result could be false negative due to tcdB gene mutation, or it could be due to toxin B-/binary toxin producing strain. According to our results, GDH EIA is a reliable initial screening test to be applied in high risk patients. Though, it would be an appropriate approach to verify GDH EIA positive results by performing either immuno diagnostic tests which detect toxin A and B or toxin B gene based molecular tests.

Keywords: Clostridium difficile; ToxinA; Toxin B; Diarrhea; Diagnostic tests.

1. Giriş

C.difficile ilk olarak 1935 yılında yenidoğan çocukların dışkı mikrobiyotası araştırıldığında tanımlanmıştır. Kültür ortamında zor üretilmesi ve morfolojisi nedeniyle *Bacillus difficile* olarak isimlendirilmiştir (1). Yeni doğanlarda bu bakterilerin taşıyıcılığının herhangi bir hastalık oluşturmaması nedeniyle mikrobiyota üyesi olarak kabul edilmiştir. Bakteri patojenitesinde önemli rolü olan toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) üreten toksijenik suşlar var olduğu gibi, toksin üretmeyen non-toksijenik suşlar da bulunmaktadır. Toksin A'nın kemotaktik aktivite gösterdiği ve nötrofillerin ileuma infiltrasyonunu ve sitokin salgılamalarını stimüle ettiği gösterilmiştir. Toksin A ayrıca hücreler arası bağların bozulmasına bağlı olarak barsak duvarında permabilite artmasına sebep olarak diyare oluşumuna neden olmaktadır. Sitotoksin ise, invivo ve invitro ortamlarda endositoz yolu ile barsak epitel hücrelerine girerek ve bu hücrelerde aktin depolimerizasyonuna neden olmaktadır (2).

Toksinlerden en az birinin üretilmesi, hastalığın gelişmesi için yeterli görülmektedir (3, 4). Son zamanlarda ise daha virülen olan

027/NAP1/BI kökeninin tcdC geninde delesyon nedeni ile yüksek miktarda toksin A ve B sentezlemekle beraber aynı zamanda üçüncü toksin olarak tanımlanan 'binary toksin' ürettiği anlaşılmıştır. Bu toksin binary ADP-ribozilasyon toksinleri ailesine aittir ve yaklaşık suşların %17-23'ünde tespit edilebilmektedir (2, 5, 6). Toksijenik *C.difficile* suşlarının çeşitli gastrointestinal hastalıklara ve antibiyotiğe bağlı ishallerle neden olduğu açıkça bilinmektedir.

Bu çalışmada ESOĞÜ Tıp Fakültesi Hematoloji ve Onkoloji kliniklerinde yatan terapötik veya profylaktik amaçlı geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı sonrasında diyare gelişen hastaların dışkı örneklerinde, glutamat dehidrogenaz enzim (GDH), toksin A ve B ve toksin B geninin saptanması amaçlanmıştır.

2. Gereç ve Yöntemler

Örneklerin alındığı hasta popülasyonu

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin Hematoloji ve Onkoloji kliniklerinde yatan, terapötik veya

proflaktik olarak geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı sonrasında diyare gelişen hastalar çalışma gurubuna alınmıştır.

Örneklerin toplanması

Örnekler Ocak-Haziran 2015 tarihleri arasında toplandı. Hastalardan alınan dışkı örnekleri verilen temiz, kuru ve kapaklı, dışkı kapları içinde 1 saat içinde Mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı.

Örneklerin saklanması

Dışkı örnekleri 2 steril ependorf tüpüne alınarak biri EIA testlerinde kullanmak üzere -20°C'de, diğeri ise moleküler test için -70°C'de saklandı.

EIA testleri

Dışkı örneklerinde GDH enzimi aranmasında (C. DIFF CHEK™-60 TECHLAB, Inc.) kiti kullanılmıştır. Teste başlamadan önce EIA kit içerikleri ve dışkı örnekleri oda ısısına getirildi ve üretici firma önerileri doğrultusunda test yapıldı. Ependorf tüplerine etiketleme yapıldıktan sonra her birine 200 µl diluent solüsyon konuldu. Yumuşak ve sıvı örneklerden 50 µl eklenip 10 sn vortekslenildi. 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatantlar ayrıldı. Kit prospektüsünde belirtildiği şekilde çalışıldı.

EIA plağının A1 kuyucuğuna 1 damla (50 µl) pozitif kontrol ve B1 kuyucuğuna ise bir damla diluent negatif kontrol için konuldu. Diğer kuyucuklara hazırlanmış örneklerden 100'er µl ilave edildi. Plakların ağzı kapatıldıktan sonra 37°C'de 50 dk süre ile inkübe edildi. Süre bitiminde kuyucuklar otomatik yıkama cihazı (BIO-TEK) EL×50 kullanılarak 5 kez yıkandı. Daha sonra 2 damla (100 µl) substrat her kuyucuğa eklenerek 10 dk oda ısısında inkübe edildi. Süre bitiminde stop solüsyonu ile reaksiyon durduruldu. Kuyucuklar 450 nm dalga boyunda BIO-TEK EL×800 cihazında okutuldu. Absorbans değeri 0.120'den düşük olan örnekler negatif, yüksek çıkan örnekler ise pozitif olarak kabul edildi.

Örneklerde toksin A ve B varlığı *C.difficile* Tox A/B II™ TECHLAB, Inc. kiti

kullanılarak araştırıldı. Teste başlamadan önce EIA kit içerikleri ve dışkı örnekleri oda ısısına getirildi. Ependorf tüplerine etiketleme yapıldıktan sonra her birine 200 µl diluent solüsyon konuldu. Yumuşak ve sıvı örneklerden 50 µl eklendi. Tüpler 10sn vortekslenip, 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar ayrılarak kit prospektüsünde belirtildiği şekilde işleme alındı.

Hazırlanmış hasta örneklerinden 100'er µl kuyucuklara ilave edildi. Plakların ağzı kapatıldıktan sonra 37°C'de 50 dk süre ile inkübe edildi. Süre bitiminde kuyucuklar otomatik yıkama cihazı (BIO-TEK) EL×50 kullanılarak 5 kez yıkandı. Daha sonra 2 damla (100 µl) substrat her kuyucuğa eklenerek 10 dk oda ısısında inkübe edildi. Süre bitiminde stop solüsyonu ile reaksiyon durdurulduktan sonra kuyucuklar 450 nm dalga boyunda BIO-TEK EL×800 cihazında okutuldu. Absorbans değeri 0.120'den düşük olan örnekler negatif, yüksek çıkan örnekler ise pozitif olarak değerlendirildi.

Moleküler test

Dışkı örneklerinde *C.difficile*'e ait toksin B genini saptamak için BD GeneOhm™ Cdiff Assay kiti kullanıldı. Teste başlamadan önce dışkı örnekleri ve kit içerikleri oda ısısına getirildi. Ependorf tüpündeki örnekler 15 sn boyunca yüksek hızda vortekslenildikten sonra bir steril eküvyon örnek tüpüne batırılarak örnek alındı. Eküvyon örnek tamponu tüpüne yerleştirilerek ve fazla kısmı kırıldı ve tüpün kapağı kapatıldı. Tüp yüksek devirde 1dk vortekslenildi. Örneği seyreltmek için örnek tamponundan 40 µl bir tüpe aktarıldı. Daha sonra bu solüsyondan 10 µl lizis tüpüne aktarılıp 5dk vortekslenildi. Lizis tüpü kısa süre santifüje edildikten sonra 7dk 95°C lik ısı bloğunda bekletildi. Daha sonra lizatlar buz üzerine konuldu. Ana karışım tüpüne de 225 µl örnek tampon eklenerek buz üzerinde bekletildi. Smart Cycler tüpleri soğutma bloğu üzerinde yerleştirildikten sonra rekonstitüsyon yapılmış 25 µl ana karışım tüplere ilave edildi. Her lizise uğratılmış örnekten 3'er µl bu tüplere eklendi ve tanımları yapıldı.

3 µl kontrol DNA bir tüpe pozitif kontrol için ve 3 µl örnek tamponu negative kontrol için diğer bir tüpe aktarıldı. Smart Cycler tüpleri 5-10sn santrifüj edildi. Tüpler cihaza yüklenmeden önce Smart Cycler soğutma bloğu üzerinde tutuldu. BD GeneOhm Cdiff protokolü ile bir çalışma hazırlandıktan sonar Smart Cycler tüpleri 1-core modülüne yerleştirildi ve çalışma başlatıldı ve sonuçlar bir saat sonra kaydedildi.

İstatistiksel analiz

Veriler SPSS 21.0 (Stastical Programme Social Sciences) bilgisayar programında ki-kare testi ile yorumlandı.

3. Bulgular

Çalışmamızda Ocak-Haziran 2015 tarihleri arasında Hematoloji ve Onkoloji kliniklerinde antibiyotik kullanımı sonrasında diyare gelişen 82 hastaya ait dışkı örneği incelendi. Dokuz örnekte (%10.97) en az 2 tanısal testle pozitif sonuç alındı. Çalışmamızda *C.difficile* enterokoliti (CDE) saptadığımız 9 hastanın hepsi malignansili olup ayrıca 4 hastada diabetes mellitus mevcuttu. Bu hastaların 4'ü piperasin\tazobaktam almaktaydı ve diyare oluşumu en erken hastanede yatışın 3. gününde gerçekleşti. GDH EIA testi örneklerin 26'sında (%31.7) pozitif ve 56'sında (%68.3) ise negatif olarak saptandı (Tablo1).

Tablo 1. GDH EIA testi sonuçları

	N	%
Pozitif	26	31.7
Negatif	56	68.3
Toplam	82	100.0

GDH EIA testinde pozitif bulunan 26 örnekten 17'sinde diğer iki testle negatif sonuç alındı ve bu örnekler negatif olarak yorumlandı. Toksin varlığı araştırılması için

kullanılan toksin A ve B EIA test sonuçlarına göre, 82 örnekten 8'i (%9.8) pozitif ve 74'ü (%90.2) negatif olarak belirlendi (Tablo 2).

Tablo 2. Toksin A ve B EIA testi sonuçları

	N	%
Pozitif	8	9.8
Negatif	74	90.2
Toplam	82	100.0

Real-Time PCR metoduyla, 82 örnekten 6'sı (%7.3) pozitif ve 76'sı (%92.7) negatif olarak saptandı (Tablo 3).

Tablo 3. Real-time PCR testi sonuçları

	N	%
Pozitif	6	7.3
Negatif	76	92.7
Toplam	82	100.0

Elli altı (%89.02) dışkıda her üç testle de negatif sonuç elde edildi. Dokuz (%10.97) hastada ise yapılan tanısal testlerden en az iki tanesi pozitif olarak bulundu. Üç (%3.65)

örnekte ise EIA (GDH, toksin A ve B) testleri pozitif iken moleküler yöntemle negatif sonuç alındı (Tablo 4).

Tablo 4. GDH EIA, toksin A ve B EIA, Real-time PCR sonuçları

GDH Antijen EIA Testi	Toksin A ve B EIA Testi	Real-time PCR Testi	N
+	-	-	17
+	+	+	5
+	+	-	3
+	-	+	1
-	-	-	56
Toplam			82

4. Tartışma ve Sonuç

C.difficile dünyada hem nozokomiyal, hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara sebep olabilen önemli bir patojendir. Bu bakteriye bağlı enfeksiyonların morbidite ve mortalitesinde belirgin bir artış gözlenmektedir (7, 8). ABD, Kanada ve Avrupa ülkelerinde son 10 yılda CDE insidansında 2-4 kat artış olduğu bildirilmiştir (8, 9). Bu artış demografik durumun değişmesi, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının artması ve yeni florokinolon antibiyotiklere karşı direnç gösteren daha virülen suşların ortaya çıkması gibi bir çok faktöre bağlanmaktadır. Farklı nedenlerle gerek terapötik gerekse profilaktik olarak kullanılan antibiyotikler sadece patojen bakterilere etki yapmamakta ve normal mikrobiyota üyeleri arasındaki ekolojik dengeyi de bozmaktadırlar. Antibiyotik kesildikten sonra barsak mikrobiyotasına yaptığı etki 8 hafta kadar sürebilmekte ve bu süre içinde *C.difficile*'le bağlı enfeksiyonlar ortaya çıkabilmektedir. CDE'lerinin gelişiminde ileri yaş, kullanılan ilaçlar (antibiyotik, antiperistaltik, immün süpresif, antineoplastik, vb.) yapılan girişimler (lavman, nazogastrik tüp), altta yatan ciddi hastalıklar (kanser, AIDS, böbrek yetmezliği), hastanede kalış süresi gibi farklı risk faktörleri rol oynayabilmektedir. CDE tanısı dışkıda toksin veya toksin geni araştırılması temeline dayandırılmaktadır.

Çalışmamızda 82 immüdüşkün hastada CDE oranı %10.97 (9/82) olarak saptandı.

Ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda CDE saptanma oranları %3.2-24 arasında değişmektedir (10, 11). Çalışmalar arası farklı oranların elde edilmesi, seçilen hasta grupları, tanısal testler, kullanılan antibiyotikler, örneklerin transportu ve saklama koşullarıyla ilgili olabilir. Çalışmamızda CDE saptadığımız 9 hastanın hepsi malignansili olup ayrıca 4 hastada diabetes mellitus mevcuttu. Bu hastaların 4'ü piperasin\tazobaktam almaktaydı ve diğer 5 hastada ise herhangi bir altta yatan hastalık mevcut değildi. Hastalar arasında diyare gelişmesi en erken 3. günde gerçekleşti.

Analia ve arkadaşları, İspanya'da 2013 yılında 225 diyareli kanser hastasında yaptıkları araştırmada, GDH antijen, toksin A ve B ve PCR yöntemi uygulayarak *C.difficile* toksijenik türlerinin oranını %17.3 olarak bildirmişler (12). Son zamanlarda bir çok ülkede CDE insidansında artış görülmektedir ve bu artış ile beraber, *C.difficile* ribotip 027 NAP1/B1 ve *tcd A-/tcdB+* gibi varyant izolatlarla bağlı salgınların sıklığında bir artış yaşanmaktadır. Yüksek mortaliteye neden olan bu virülen suşlar yaygınlık açısından ülkeler arasında değişkenlik göstermektedir (13, 14).

Klasik bilgilere göre CDE genelde hastane kaynaklıdır ama son zamanlarda toplum kaynaklı olgularda belirgin bir artış olduğu ve düşünülenden daha yaygın hale geldiği

bildirilmektedir. ABD’de her yıl yüz bin kişide 6.9-46 arasında değişen toplum kaynaklı *C.difficile* olgusu saptanmaktadır (15).

CDE’ine bağlı diyareyi diğer ishal nedenlerinden klinik olarak ayırt etmek zordur. Bu nedenle CDE’nin mikrobiyolojik tanısı çok önemlidir ve hastaların sağaltımı ve hastalığın kontrolü için kritik önem taşımaktadır (16, 17). Toksik ve nontoksik *C.difficile* suşları olduğu için klasik kültür yönteminin tanısal değeri bulunmamaktadır. Tanı için *C.difficile* toksinlerinin saptanması şarttır. Bu amaçla kullanılan tanısal testler arasında hücre sitotoksitesi ve sitotoksik kültür yöntemleri altın standarttır (18, 19). Sonuç almak için 1-5 gün bekleme rutin kullanımını kısıtlamaktadır (17).

Son yirmi yıldır EIA testlerinin yanısıra CDE tanısı için glutamate dehidrojenaz (GDH) EIA ve nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) geliştirilmiştir. Ancak bu tanı yöntemlerinin tek başına duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür (20). Bu nedenle CDE tanısı için iki veya üç aşamadan oluşan algoritmalar önerilmiştir. İngiltere’de CDE tanısı için şu anda kullanılmakta olan 25’den fazla farklı algoritma bulunmaktadır (21). Son zamanlarda çoğu laboratuvar toksik türlerin nontoksik türlerden ayrımı için iki basamaklı bir algoritmayı kullanmaktadır. İlk basamağında GDH testi olan bu algoritmaya göre ilk önce GDH testi yapılmakta, eğer test negatif ise ileri test yapılmamaktadır. Eğer pozitif ise suşun toksik olduğunu başka bir hızlı testle doğrulanması gerekmektedir. Her iki test sonucu pozitif ve hastada semptom var ise CDE tanısı konulmaktadır. GDH testi pozitif, toksin testi negatif ise hastanın toksik olmayan bir suşu taşıdığı veya toksin testinin yalancı negatif sonuç verdiği düşünülmektedir (22).

Çalışmamızda elli altı örnekte her üç testle negatif sonuç elde edildi. Dokuz hastada ise yapılan testlerden en az iki tanesi pozitif olarak bulundu. Üç hastada ise EIA (GDH, toksin A ve B) testleri pozitif iken moleküler

yöntemle negatif sonuç alındı. Moleküler yöntem ile saptanan ve yalancı negatiflik

olarak kabul ettiğimiz bu durumun *tcdB* geninde gerçekleşen mutasyon ve ya sadece toksin A/binary toksin sentezleyen suş nedeniyle olduğu düşünüldü.

Stamper ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise sitotoksik ve toksijenik kültür testleri pozitif olan bir hasta örneğinde PCR testi sonucu yalancı negatif olarak saptanmıştır (23). Benzer bir çalışmada 4 örnek GDH antijen ve toksin A ve B EIA testi sonucu pozitif ve PCR sonucu yalancı negatif olarak belirlenmiştir (24). Son zamanlarda *tcdB* gen bölgelerinde mutasyonlar ve delesyonlar olan toksijenik suşların varlığı bilinmektedir (25, 26).

Ayrıca toksin A+/binary toksin + ve toksin B negatif olan yeni bir suşun varlığı da saptanmıştır (27). Toksik B hastalık oluşumunda en önemli virülans faktörü kabul edildiği için bu tip varyantların raporlanması çok nadir olmaktadır. Toksik B negatif olan bu suş genetik olarak Kuzey Amerika’da salgına neden olan BI/NAP1/027 ribotipinden farklıdır bu nedenle *tcdB*’nin yeni varyantların evrimi için izlenmesi gerekmektedir. PCR testi ile yalancı negatif sonuçlar nedeniyle toksin gen bölgesini hedefleyen testler yerine *in vivo* toksin üretimine yönelik testlerin geliştirilmesine ağırlık verilmesi gerektiği de vurgulanmaktadır. Ayrıca *C.difficile* toksijenik suşları taşıyan hastalarda başka nedenlere bağlı olarak da ishal gelişebileceği unutulmamalıdır. Moleküler yöntemler ile pozitif sonuçlar söz konusu olduğunda doğru tanı için bu durumun hastanın kliniği ile birlikte değerlendirilmesi gereklidir. Çünkü pozitif moleküler test sonucu örnekte mutlaka canlı organizmaların bulunduğu anlamına gelmemektedir. Ancak *tcdB* geninin toksijenik *C.difficile* suşuyla oluşan enfeksiyon olabileceğini düşündürür varlığını ıspatlar. Bu çalışmada bir hasta örneğinde GDH antijen EIA testi ve Real-time PCR sonucu pozitif, toksin A ve B EIA testi negatif olarak saptanmıştır. Bu durumun toksin titresinin azlığı nedeniyle olabileceği düşünülmüştür.

Bulgularımız ışığında geniş spektrumlu antibiyotik uygulanan ve diyare gelişen kanser hastalarında CDE tanısı için yüksek özgüllük ve duyarlılıkta bulduğumuz GDH EIA testini ön test olarak önermekteyiz. Pozitif sonuçların toksin A ve B yi saptayan EIA testi ve toksin

B genini saptayan moleküler test ile doğrulanması uygun olacaktır. Ancak toksin A ve B EIA ve moleküler testlerle nadir de olsa yalancı negatifliğin söz konusu olabileceği de unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Snyder, M.L. Further studies on Bacillus difficilis (Hall and O'Toole). *J Infect Dis.* 1937;223-31.
2. Poxton, I. J. McCoubrey, and G. Blair, The pathogenicity of Clostridium difficile. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7:421-7.
3. Lyerly, D.M. and T.D. Wilkins, Commercial latex test for Clostridium difficile toxin A does not detect toxin A. *J Clin Microbiol*, 1986;23:622-3.
4. Al-Barrak, A. et al. An outbreak of toxin A negative, toxin B positive Clostridium difficile-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital. Canada communicable disease report= Releve des maladies transmissibles au Canada, *Can Commun Dis Rep.* 1999;25:65.
5. O'Connor, J.R. S. Johnson, and D.N. Gerding, Clostridium difficile infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. *Gastroenterology*, 2009;136:1913-24.
6. Eckert, C. et al. Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive Clostridium difficile strains that do not produce toxins A and B. *New Microbes and new Infect*, 2015;3:12-17.
7. Wiström, J. et al. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47:43-50.
8. Redelings, M.D. F. Sorvillo, and L. Mascola, Increase in Clostridium difficile-related mortality rates, United States, 1999–2004. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:417-9.
9. Elixhauser, A. and M. Jhung, Clostridium difficile-associated disease in US hospitals, 1993–2005. 2008;1-11.
10. Boral, Ö.B. Clostridium difficile İnfeksiyonu Ön Tanılı Hastaların Dışkı Örneklerinde Toksin A ve B'nin Belirlenme Sıklığı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2002;32:220-4.
11. Lale, Z. Et Al. İshalli Hastaların Dışkı Örneklerinde Clostridium Difficile Toksin A/B Sıklığının Araştırılması. *Ankem Dergi*, 2013;27:55-9.
12. Garzotto, A.R. et al. Risk factors associated with Clostridium difficile infection in adult oncology patients. *Support Care in Cancer*, 2015;23:1569-77.
13. Warny, M. et al., Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *The Lancet*, 2005;366:1079-84.
14. Cohen, S. et al., Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2010;31:431-55.
15. O'donoghue, C. and L. Kyne, Update on Clostridium difficile infection. *Curr Opin Gastroenterol.* 2011;27:38-47.
16. Garey, K.W. et al. Prevalence of diarrhea at a university hospital and association with modifiable risk factors. *Ann Pharmacother.* 2006;40:1030-4.
17. Planche, T. and M.H. Wilcox, Diagnostic pitfalls in Clostridium difficile infection. *Infect Dis Clin North Am.* 2015;29:63-82.
18. Bartlett, J.G. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med.* 2002;346:334-9.
19. Poutanen, S.M. and A.E. Simor, Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. *CMAJ*, 2004;171:51-8.
20. Freeman, J. et al. Comparison of the efficacy of ramoplanin and vancomycin in both in vitro and in vivo models of clindamycin-induced Clostridium difficile infection. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:717-25.
21. Ticehurst, J.R. et al. Effective detection of toxigenic Clostridium difficile by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1145-9.
22. Carroll, K.C. Tests for the diagnosis of Clostridium difficile infection: the next generation. *Anaerobe.* 2011;17:170-4.
23. Stamper, P.D. et al. Comparison of a commercial real-time PCR assay for tcdB detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing Clostridium difficile in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2009;47:373-8.
24. Kvach, E.J. et al. Comparison of BD GeneOhm Cdiff real-time PCR assay with a two-step algorithm and a toxin A/B enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of toxigenic Clostridium difficile infection. *J Clin Microbiol.* 2010;48:109-14.
25. Cohen, S.H. Y.J. Tang, and J. Silva Jr, Analysis of the pathogenicity locus in Clostridium difficile strains. *J Infect Dis.* 2000;181:659-63.
26. Rupnik, M. et al. Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of Clostridium difficile. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;148:197-202.
27. Perelle, S. et al. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by Clostridium difficile CD196. *Infect Immun.* 1997;65:1402-7.